

明細書

galectin-2 遺伝子内一塩基多型を用いた炎症性疾患の判定方法

技術分野

本発明は、galectin-2（ガレクチン-2）遺伝子に存在する遺伝子多型を検出することを含む炎症性疾患の診断方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用に関する。

背景技術

ライフスタイルの変化及び新しい薬理学的アプローチにも関わらず、心筋梗塞を含む冠状動脈疾患は多くの国々において主要な死亡原因となっている（Breslow, J. L., Nature Med. 3, 600-601, 1997; Braunwald, E., N. Engl. J. Med., 337, 1360-1369, 1997）。従って、それらの発症における遺伝的及び環境的因素を同定することが強く望まれている。

共通の遺伝的変異は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に罹患する危険性と顕著に関連していることが知られている（Risch, N., et al., Science, 273, 1516-1517, 1996; Collins, F. S., et al., Science, 278, 1580-1581, 1997; Lander, E. S., et al., Science, 274, 536-539, 1996）。多遺伝子性疾患の感受性遺伝子を同定するには、「連鎖」を利用する方法と、「関連」を利用する方法がある。連鎖解析では、疾患感受性遺伝子の座位と遺伝マーカー（主としてマイクロサテライト）の座位が連鎖しているかを検出する、すなわち遺伝子座位間の関係を調べるのに対して、関連解析では特定の遺伝マーカー（主として一塩基多型：S N P）のどの型（アレル：対立遺伝子）が疾患と関連しているかを検出する、つまり対立遺伝子間の関係を調べる。従って、共通の変異をマーカーとして用いる関連解析は疾患関連遺伝子の局在に対する連鎖解析よりもずっと強力といえる。一塩基多型（S N P s）は、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーとなる。S N P sは、遺伝子産物の質や量に直接影響を与えたり、ある疾患や薬剤による重篤な副作用に対する危険性を増やすことがある。よって、多くのS N P sを探索するこ

とにより、疾患関連遺伝子の同定や薬剤による副作用を避ける診断方法の確立に寄与できることを期待される。

遺伝子変異と心筋梗塞との関係については、これまでヒトプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の遺伝的要因を判定する方法(特開2002-136291号公報)などがある。しかしながら、心筋梗塞と関連のある遺伝子変異の解明は未だ十分なものではない。

一方、現在までの所、哺乳類には10種類のガレクチンが知られている。そのうちの galectin-2 は galectin-1 に対して 43% と高い相同性を示す。galectin-2 は galectin-1 と同様、14 kDa のサブユニット 2つからなる非共有結合性の二量体を形成し、還元剤非存在下では自己凝集し、活性を失う。また、galectin-2 は galectin-1 と比較して組織分布は狭い。galectin-1 の場合、筋肉等の間充組織をはじめ様々な細胞系列に豊富に存在するが、galectin-2 は正常成人組織の中では下部小腸を主とした上皮細胞に多く認められる。galectin-2 の詳細な機能についてはまだ解明されていない (Trends in Glycoscience and Glycotechnology Vol. 9, No. 45, (1997) pp. 87-93)。

発明の開示

本発明は、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関与する新規な一塩基多型(SNP)を同定することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、同定した SNP を利用して、心筋梗塞等の炎症性疾患の診断法、又は炎症性疾患の治療薬の開発法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、galectin-1 および galectin-2 遺伝子産物が心筋梗塞感受性遺伝子産物 lymphotoxin-alpha (LTA) に結合すること、並びに galectin-2 遺伝子内の新規一塩基多型(SNP)が心筋梗塞の発症進展に関連していることを同定することにより本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

好ましくは、galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

さらに好ましくは、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。

本発明の別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 4 の何れかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

好ましくは、プライマーはフォワードプライマー及び／又はリバースプライマーである。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの 1 種以上を含む、炎症性疾患診断用キットが提供される。好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3 2 7 9 番目の塩基における C/T の多型を検出することを含む、galectin-2 の発現状態の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患

の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、候補物質の存在下でリンホトキシン- α (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のインtron 1 の塩基配列において 3279 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、galectin-2 の転写活性の測定方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のインtron 1 の塩基配列において 3279 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記のスクリーニング方法により得られる galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質が提供される。

本発明の方法で好ましくは、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。さらに好ましくは、前記リポーター遺伝子はルシフェラーゼ遺伝子である。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のインtron 1 の塩基配列において 3279 番目の塩基における C/T の多型を含む galectin-2 遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される試料とを接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、galectin-2 の転写制御因子のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、検出はゲルシフトアッセイにより行われる。

図面の簡単な説明

図1は、LTAとgalectin-1及び-2とのインビトロでの結合を確認した実験の結果を示す。

図2は、galectin-2遺伝子のイントロン1の3279C>TのSNPが転写活性に与える影響を調べた結果を示す。

図3は、galectin-2と微小管との相互作用を調べた結果を示す。aはTAPのタグのgalectin-2と相互作用タンパク質の単離を示す。bは、内因性 α -チューブリンとFlagのタグのついたgalectin-2又はLTAとの共免疫沈降の実験結果を示す。cは、U937細胞における内因性 α -チューブリンと内因性galectin-2又はLTAとの共局在の実験結果を示す。

図4は、冠状動脈粥腫切除切片におけるgalectin-2とLTAの発現及び共局在を調べた結果を示す。aは抗ヒトLTAで染色、bは抗ヒトgalectin-2で染色、cはモノクローナル抗SMC α -アクチンで染色、dはモノクローナル抗CD68で染色した。eは、抗LTA抗体及び抗galectin-2抗体で二重染色した。fは、抗ヒトLTAで染色した。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、galectin-1およびgalectin-2遺伝子産物が心筋梗塞等の炎症性疾患感受性遺伝子産物として知られているlymphotoxin-alpha(LTA)(Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)産物と結合することを同定した。さらに、galectin-2遺伝子内の新規一塩基多型(SNP)を同定し、それぞれ約2000人の心筋梗塞患者群とコントロール群についてPCR-DNAシークエンス法によりタイピングし、相関解析(カイ二乗検定など)を行った結果、この新規SNPの頻度が統計学的に有意に心筋梗塞患者で少ないと見出した。さらにルシフェラーゼアッセイ法を用いた実験により、この新規SNPが実際に生物学的機能を有し、このgalectin-2遺伝子産物量の変化が心筋梗塞に限らず様々な炎症性疾患を引き起こすことを明らかにした。

上記の通り、本発明では、LTAタンパク質に結合する新たな分子として

galectin-1 および galectin-2 タンパク質を同定した。さらに galectin-2 遺伝子内の新規 S N P が生物学的な機能を有し、心筋梗塞等の疾患に関連することを同定した。従って、本発明により同定された galectin-2 遺伝子の新規 S N P を利用することにより、心筋梗塞等の炎症性疾患の新たな診断、予防法、治療薬の開発が可能になる。以下、本発明の実施の形態についてさらに具体的に説明する。

[1] 炎症性疾患の判定方法

本発明の方法は、炎症性疾患と関連性を示す galectin-2 遺伝子に存在する遺伝子多型、特に一塩基多型（S N P s）を検出することによって、炎症性疾患の発症の有無、あるいは炎症性疾患の発症の可能性を判定する方法である。

本発明において「galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型（一塩基多型など）を検出する」とは、(i) 当該遺伝子多型（遺伝子側多型と称する）を直接検出すること、及び (ii) 前記遺伝子の相補配列側に存在する遺伝子多型（相補側多型と称する）を検出し、その検出結果から遺伝子側多型を推定することの双方を指すものとする。ただし、遺伝子側の塩基と相補配列側の塩基とが完全に相補的な関係にあるとは限らないという理由から、遺伝子側多型を直接検出することがより好ましい。

galectin-2 遺伝子に存在する遺伝子多型の好ましい具体例としては、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3279 番目の塩基における C/T の多型を挙げることができる。

本明細書において、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列において 3279 番目の塩基は、配列番号 2 に示す galectin-2 遺伝子のゲノム配列の 3449 番目の塩基に相当する。

例えば、後記表 1 に示すように、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3279 番目の塩基が C である場合 (galectin-2 イントロン 1 3279 C) は、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

これに対し、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3279 番目の塩基が T である場合 (galectin-2 イントロン 1 3279 T) は、

炎症性疾患が発症していない、あるいは発症の可能性が低いと判定できる。

本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。

また、疾患の「判定」は、上記の一塩基多型の検出法による結果と、所望により他の多型分析（V N T R や R F L P）及び／又は他の検査結果と合わせて行うこともできる。

また、本明細書において、「炎症性疾患」とは、炎症性病態との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定はされないが、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー反応、細菌性ショック、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患などが挙げられ、特には心筋梗塞が挙げられる。

(検出対象)

遺伝子多型の検出の対象は、ゲノムDNAが好ましいが、場合によっては（つまり多型部位及びその隣接領域の配列がゲノムと同一または完全相補的になっている場合）cDNA、又はmRNAを使用することもできる。また、上記対象を採取する試料としては、任意の生物学的試料、例えば血液、骨髓液、精液、腹腔液、尿等の体液；肝臓等の組織細胞；毛髪等の体毛等が挙げられる。ゲノムDNA等は、これらの試料より常法に従い抽出、精製し、調製することができる。

(増幅)

遺伝子多型を検出するにあたっては、まず遺伝子多型を含む部分を増幅する。増幅は、例えばPCR法によって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法等で行ってもよい。

プライマーの選択は、例えば、配列番号1（又は配列番号3）に示される配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基、より好ましくは10～50塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅するように行う。

プライマーは、前記の一塩基多型部位を含む所定塩基数の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得る限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、

付加を含んでいてもよい。

増幅のために用いるプライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるようにフォワードプライマー又はリバースプライマーの一方が一塩基多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。プライマーは必要に応じて蛍光物質や放射性物質等により標識することができる。

(遺伝子多型の検出)

遺伝子多型の検出は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識してもよい。プローブは、前記の一塩基多型部位を含み、被検試料とハイブリダイズし、採用する検出条件下に検出可能な程度の特異性を与えるものである限り何等限定はない。プローブとしては、例えば配列番号1(又は配列番号3)に示す配列における前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基の配列、より好ましくは10～50塩基の配列、又はそれらの相補配列にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを用いることができる。また、一塩基多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにオリゴヌクレオチドを選択するのが好ましい。該オリゴヌクレオチドは、プローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでいてもよい。また、プローブには、RCA (rolling circle amplification) 法による増幅に用いられる一本鎖プローブ(パドロックプローブ)のように、ゲノムDNAとアニールし、環状になることによって上記のプローブの条件を満たすプローブが含まれる。

本発明に用いるハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジエントな条件である。ここで、「ストリンジエントな条件」としては、例えば、例えば、モレキュラークローニング・ア・ラボラトリーマニュアル第2版 (Sam

brook et al., 1989) に記載の条件等が挙げられる。具体的には、例えば、 $6 \times SSC$ ($1 \times SSC$ の組成: 0. 15M NaCl、0. 015M クエン酸ナトリウム、pH 7. 0)、0. 5% SDS、 $5 \times$ デンハート及び 100 mg/ml ニシン精子DNAを含む溶液中プローブとともに 65°C で一晩保温するという条件等が挙げられる。

プローブは、一端を基板に固定してDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型に対応するプローブのみが固定されても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。

遺伝子多型の検出は、制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) により行うこともできる。この方法では、一塩基多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料の多型を分析する。

遺伝子多型の検出は、增幅産物を直接配列決定することによって行つてもよい (ダイレクトシークエンシング法)。配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert 法等の公知の方法により行うことができる。

遺伝子多型の検出はまた、変性勾配ゲル電気泳動法 (DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis)、一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP: single strand conformation polymorphism)、対立遺伝子特異的PCR (allele-specific PCR)、ASO (allele-specific oligonucleotide) によるハイブリダイゼーション法、ミスマッチ部位の化学的切断 (CCM: chemical cleavage of mismatches)、HET (heteroduplex method) 法、PEX (primer extension) 法、RCA (rolling circle amplification) 法等を用いることができる。

[2] 炎症性疾患診断用キット

前記のプライマー又はプローブとしてのオリゴヌクレオチドは、これを含む炎症疾患診断用キットとして提供できる、キットは、上記遺伝子多型の分析法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識、緩衝液等を含んでい

てもよい。

[3] galectin-2 の発現状態の分析方法

本発明によればまた、前記した一塩基多型を検出することによって、galectin-2 の発現状態を分析することができる。

例えば、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が C である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 C) は、galectin-2 の発現量が低いと判断できる。これに対し、配列番号 1 に示す galectin-2 遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 3 2 7 9 番目の塩基が T である場合 (galectin-2 イントロン 1 3 2 7 9 T) である場合は、galectin-2 の発現量が高いと判断できる。

[4] 炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法

本発明によれば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択することによって、炎症性疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。例えば、候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大又は減少させる物質を選択することができ、特に好ましくはその発現量を増大させる物質を選択することができる。さらに本発明によれば、候補物質の存在下でリンホトキシン- α (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択することによって、炎症性疾患の治療薬をスクリーニングすることができる。

上記スクリーニングの一例としては、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内における galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を変化させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレーライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であ

り、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

[5] galectin-2 の転写活性の測定方法

本発明によればまた、前記した一塩基多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって galectin-2 の転写活性を測定することができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、一塩基多型がプロモーター部位に存在する場合は、その一塩基多型を含む遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を培養し、レポーター活性を測定すれば、一塩基多型による転写効率に違いを測定することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、アセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子が用いられる。

[6] galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する物質のスクリーニング方法

本発明においては、前記した一塩基多型を含む galectin-2 遺伝子断片を細胞に導入し、galectin-2 の転写活性を阻害又は促進する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによって galectin-2 転写活性を阻害又は促進する物質をスクリーニングすることできる。

本発明の好ましい態様によれば、前記 galectin-2 遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、galectin-2の発現量が有意に高いことが認められる一塩基多型（例えば、galectin-2 イントロン 1 3279T）を有する遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を候補物質の存在下又は非存在下の両方の場合について培養し、候補物質の存在下で培養を行った場合にレポーター活性が下がれば、その候補物質はgalectin-2転写活性阻害物質として選択することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、上記に挙げた遺伝子が用いられる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレーライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

上記のスクリーニング法により得られるgalectin-2の転写活性を阻害又は促進する物質もまた本発明の範囲内である。このようなgalectin-2の転写活性を阻害又は促進する物質は、心筋梗塞治療剤、抗炎症剤、免疫抑制剤などの各種薬剤の候補物質として有用である。

[7] galectin-2 の転写制御因子のスクリーニング方法

本発明においてはまた、前記した一塩基多型を含む遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することによって、galectin-2 の転写制御因子をスクリーニングすることができる。前記の一塩基多型を含む遺伝子断片と galectin-2 の転写制御因子の存在が予想される物質との結合の検出は、ゲルシフト法（電気泳動移動度シフト解析：electrophoretic mobility shift assay, EMSA）、DNase I フットプリント法等によって行うことができるが、ゲルシフト法が好ましい。ゲルシフト法では、タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下するので、³²Pで標識した遺伝子断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常のバンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によつて限定されるものではない。

実施例

(A) 方法・材料

(1) *E. coli* two hybrid system

BacterioMach™ Two Hybrid System construction kit (Stratagene 社製) を用いて行った。ライプラリー作製のための培養ヒト冠状動脈血管平滑筋細胞(HCASMC)は、BioWhittaker 社より購入した。 1×10^7 個の細胞より FastTrack 2.0 kit(invitrogen 社)を用いて mRNA を調製し、 $5 \mu\text{g}$ の HCASMC mRNA を用い、添付プロトコールに従って cDNA ライプラリーを作製し、添付プロトコールに従って Two-hybrid スクリーニングを施行した。

(2) リコンビナント galectin-1、-2、-3 及び LTA の作製、免疫沈降による LTA と galectin の結合確認

galectin-1、-2、-3 は、全長を pET 28 vector system (Novagen 社) で組み換え体を作製し、添付プロトコールに従って大腸菌で発現、精製した。また、LTA は pET29 system (Novagen 社) により作製した。抗 LTA 抗体 (R&D system 社) は HiTrap NHS-activated HP sepharose (Amersham 社) に添付プロトコールに従って架橋した (抗 LTA 抗体セファロース)。LTA-galectin の結合実験は、10ml binding buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl] 中に $5 \mu\text{g}$ の galectin-1 あるいは galectin-2 あるいは galectin-3 を加え、さらに 1 時間攪拌した。1600 回転で 10 分間遠心し、上清を捨て、沈殿を wash buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40] で 3 回洗浄し、 $50 \mu\text{l}$ の 5 × SDS-sample buffer (125mM Tris/HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% beta-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue, pH6.8) で溶解しサンプルとした。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に移し、抗 T7 抗体 (Novagen 社) を用いて、ECL 法 (Amersham 社) によりシグナルを検出した。COS7 細胞 (Riken cell bank) を用いた強制発現系による LTA と galectin-2 の相互作用 (結合) の確認では、pFLAG-CMV-5a vector (コスモバイオ社) に LTA を、pCMV-Myc vector (Clontech 社) に galectin-2 を組み換え体として導入し、COS7 細胞に FuGene reagent (ロッシュ社) を用いてトランスフェクションした。36 時間後の細胞を回収、細胞タンパク抽出バッファ [10mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0.5% NP-40] によりタンパクを抽出した後、非特異的吸着を抑制するために、この抽出液

に $50\mu l$ の protein A sepharose (Amersham 社) を加え 1 時間攪拌し、1 6 0 0 回転で 1 0 分間遠心し、上清を免疫沈降のサンプルとした。サンプルに $5\mu g$ の抗 LTA 抗体を加え 1 7 °C で 1 時間攪拌後、protein A sepharose $50\mu l$ を加え 1 7 °C で 1 時間攪拌し、1 6 0 0 回転で 1 0 分間遠心し、沈殿を wash buffer [10mM Tris/HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% NP-40] で 3 回洗浄してサンプルとした。 SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に移し、抗 Myc-tag 抗体 (SANTA CRUZ 社)、抗 FLAG-tag 抗体 (SIGMA 社) によりシグナルを検出した。

(3) galectin-2 遺伝子内 SNPs と心筋梗塞との相関解析

心筋梗塞患者とコントロール群、その DNA の採取方法、DNA のシークエンス法、DNA タイピング法、相関解析の統計学的手法は既報に従っている (Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650–654, 2002)。galectin-1 および galectin-2 遺伝子領域の SNPs は、それぞれ 16 人の心筋梗塞およびコントロールからの DNA を用いた PCR ダイレクトシークエンス法により同定・発見した。

(4) ルシフェラーゼアッセイ法

galectin-2 遺伝子の 3188 から 3404 までの intron 1 3279 C あるいは T の SNP を含む領域をゲノム DNA を錠型として PCR により増幅し galectin-2 promoter-pGL3-enhancer ベクターのルシフェラーゼの下流にクローニングした。これらのプラスミド $2\mu g$ 及び 100mg の pRL-TK ベクター (promega 社；トランスフェクション効率を合わせるための内部標準ベクター) を HeLa 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9004) および HepG2 細胞に FuGene reagent を用いてトランスフェクションした。24 時間後細胞を集め、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(5) タンデムアフィニティー精製

タンデムアフィニティー精製は、Rigaut, G et al. Nature Biotechnol., 17, 1030–1032 (1999) に記載の方法に準じて行った。His tag、TEV 切断部位、及び S tag を TAPtag 配列としてコードする融合カセットを pCMV-Myc ベクター (シグマ社) 中に構築した。この TAP ベクターは、サイトメガロウイルスプロモーターの制御下で哺乳動物細胞中に、カルボキシ末端に TAP タグを有しアミノ末端に Myc

タグのついた標的タンパク質を発現する。TAPベクターをHeLa細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9004）に一過性にトランスフェクションした。標的タンパク質のバンドをAPRO Life ScienceのMALDI/TOF massスペクトル測定装置により分析した。

（6）共免疫沈降実験

内因性 α -チューブリンとFlagのタグのついたgalectin-2又はLTAを用いて共免疫沈降実験を以下の通り行った。Flag又はSのタグのついたLTA、galectin-2、そしてlacZ（陰性対照）をHeLa細胞にFugeneを用いてトランスフェクションした。免疫沈降は、溶解緩衝液（20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Nonident P-40）中で行った。トランスフェクションの24時間後、細胞を溶解し、免疫沈降を抗-Flag tag M2アガロース（シグマ社）を用いて行った。HRP結合S-プロテイン（Novagen）、抗-Flag M2ペルオキシダーゼ結合体（Sigma）又はヒト α チューブリンに対するマウスモノクローナル抗体（Molecular Probes）、及びHRP結合抗マウスIgG抗体を用いて、免疫複合体を可視化した。

（7）共焦点顕微鏡分析

ポリクローナル抗ヒトgalectin-2抗血清を、大腸菌で合成した組み換えタンパク質を用いてウサギで作成した。この抗血清は、ウエスタンプロット分析によれば、構造が類似しているgalectin-1及びgalectin-3との交差反応性を示さなかった。ポリクローナル抗galectin-2抗血清、及びヤギ抗ヒトLTA IgG（R&D System）又はマウス抗ヒト α チューブリンモノクローナルIgM抗体を、Alexa二次抗体（Molecular Probes）と一緒に使用した。U937細胞（ヒューマンサイエンス研究資源バンク、JCRB9021）を、ホルボールミリストートアセテート（PM A）（20ng/ml）で30分間刺激し、固定した。その後、3%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水中で対応する一次抗体、そして対応するAlexa二次抗体と一緒にインキュベートした。

（8）免疫組織化学分析

組織試料は、16名の心筋梗塞患者から方向性冠状動脈粥腫切除術により取得した。免疫組織化学分析は、ヤギ抗ヒトLTA IgG（R&D Systems）及びウサギポリクロ

一ナル抗ヒト galectin-2 抗体を用いて既報 (Minami, M et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21, 1796–1800 (2001) ; 及び Shi, S. R., et al., Hum. Mutat. 15, 7–12 (2000)) の通り行った。隣接する切片の染色は、SMC-2 アクチン及び CD68 に対するヒト細胞型特異的モノクローナル抗体 (DAKO) を用いて行った。二重標識した免疫組織化学分析としては、切片を先ず抗 LTA 抗体とインキュベートし、それからビオチン化ブタ抗ヤギ IgG、そしてアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体とインキュベートし、3, 3' -ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (Vector Labs) で可視化した。続いて切片をウサギポリクローナル抗ヒト galectin-2 抗体とインキュベートし、そしてアルカリホスファターゼ結合ブタ抗ウサギ IgG とインキュベートし、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシリホスフェートおよびニトロブルーテトラゾリウムクロライド (BCIP/NBT) 基質系で可視化した。

(B) 結果

(1) 心筋梗塞感受性遺伝子産物 LTA に結合するタンパク質の同定 (スクリーニング)

LTA に結合する新規タンパクをスクリーニングするために *E. coli* two hybrid-system を利用し血管平滑筋細胞由来 two hybrid-library より、LTA の結合候補タンパク質として galectin-1 を同定した。

(2) LTA と galectin-1, 2 のインビトロでの結合の確認

リコンビナント galectin-1 (T7tag を N 末端側に結合) 及び LTA をそれぞれ個別に大腸菌で発現、精製後、抗 LTA 抗体架橋セファロースとこれらを反応し、洗浄後、SDS-PAGE をを行い、抗 T7 抗体を用いたウェスタンプロット法により galectin-1 を検出した (図 1 a)。

図 1 aにおいて、レーン 1 では、galectin-1 を抗 LTA 抗体セファロースを用いて免疫沈降した (陰性コントロール)。レーン 2 では、galectin-1 と LTA とをインキュベートし、複合体を抗 LTA 抗体セファロースを用いて免疫沈降した。レーン 3 では、100 ng の組換え galectin-1 を陽性コントロールとして用いた。星印は、抗 LTA 抗体セファロース中のイムノグロブリン (Ig) 重鎖及び軽鎖に

由来する非特異的バンドを示す。

また、galectin-1と高いホモロジーを有するgalectin-2および-3についても大腸菌よりリコンビナントプロテインを作製して、同様の手法によりLTAとの結合を確認したところ、galectin-2もLTAと結合することが明らかとなった（図1b）。

図1bでは、LTAと共に沈降したGalectinを、抗T7tagモノクローナル抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGを用いたウエスタンプロット分析により検出した。レーン1では、galectin-3とLTAとをインキュベートし、抗LTA抗体セファロースを用いて免疫沈降を行った。レーン2では、galectin-2とLTAとをインキュベートし、複合体を抗LTA抗体セファロースを用いて免疫沈降した。レーン3では、galectin-2を抗LTA抗体セファロースを用いて免疫沈降した（陰性コントロール）。レーン4及び5では、100ngのgalectin-3（レーン4）又はgalectin-2（レーン5）を陽性コントロールとして用いた。星印は、抗LTA抗体セファロース中のイムノグロブリン（Ig）重鎖及び軽鎖に由来する非特異的バンドを示す。

さらに、galectin-2については、LTAThr26及びLTAAsn26（Ozaki K et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002）とのCOS7細胞（サル腎臓細胞株）への共強制発現系を用いた実験系により、その結合を培養細胞レベルでも確認した（図1c）。

図1Cは、抗LTA抗体を用いたLTAとgalectin-2との共免疫沈降の結果を示す。COS7細胞にMycタグ付きgalectin-2プラスミド又はFLAGタグ付きLTAプラスミド（Thr26またはAasn26）をトランスフェクションし、ライセートを調製し、プロテインAセファロースと抗LTA抗体とを使用して免疫沈降に供した。LTAと共に沈したGalectin-2を、Myc（Galectin-2）又はFLAG（LTA）-抗モノクローナル抗体-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を使用したウエスタンプロット分析により検出した。レーン1及び2では、LTA 26 Thr（レーン1）又はLTA 26 Aasn（レーン2）をトランスフェクションして沈降させた（LTAの陽性コントロール）。レーン3では、galectin-2

をトランスフェクションして沈降させた (galectin-2 の陽性コントロール)。レーン4及びレーン5では、galectin-2 と L T A 26 Th r (レーン4) 又は L T A 26 Asn (レーン5) をコトランスフェクションし、共沈降させた。

(3) galectin-2 遺伝子内一塩基多型と心筋梗塞との相関

galectin-1 および -2 が LTA と結合することが明らかとなり、これらの遺伝子産物の機能変化が LTA の機能変化に結びつき、心筋梗塞の感受性に関連している可能性が示唆されることから、これら遺伝子内の一塩基多型 (SNPs) を新たに同定、発見し、その SNPs を用いて、患者、コントロールそれぞれ約 2300 例について case-control association study を施行した。その結果、galectin-2 遺伝子内 intron 1 3279 番目 C > T 新規 SNP の minor homozygote (TT allele) が心筋梗塞患者で有意に少ない ($\chi^2 = 25.3$, $P = 0.000005$; odds ratio = 1.6) ことを見出した (表 1) (塩基番号は変異命名による: Dunnen J.T 他、Hum. Mutation 15, 7-12, 2000)。このことから、galectin-2 intron 1 3279 の SNP が心筋梗塞にプロテクティブに働く因子と考えられ、galectin-2 の機能変化が心筋梗塞に関連している可能性が示唆された。

表1 ; 心筋梗塞と Galectin-2 の SNP との相関

Genotype	MI	Control	χ^2 [P value] (Odds ratio)<95%CI>				
			Genotype frequency	Allele frequency	Others	CC vs Others	TT vs Others
Galectin-2 intron 1							
3279C>T*							
CC	1047(46.8%)	996(41.6%)	29.6	25.5	12.8	25.3	
CT	987(44.2%)	1069(44.7%)	[0.00000038][0.00000044]	[0.00034]	[0.0000050]		
TT	202(9.0%)	329(13.7%)	(1.71)	(1.24)	(1.60)		
Total	2236(100%)	2394(100%)	<1.41-2.08><1.10-1.39><1.33-1.93>				

今回新たに同定した galectin-2 遺伝子の *intron 1* の 3279番目 C > T の新規 SNP の周辺の塩基配列（配列番号 3：但し、配列番号 3において Y は C 又は T を示す）を以下に示す。

5' -CCCCCCCAGCTCTAGGGACGACCACACCCCCACCCAGTTCTGCCTGTCTCTCTGCGCC
TTTGACTCTGTTGGGTGGGGACAAGGCTCCGGGCTGCACCCCTCCCGAGCTCTCAGCA
TCCCTATTGTCCAAGTGCACCCCTGACCCCTGGACTTCCGAGTGCTTCTGCCCTGCAGCA
GCCCCCACCTCTATCCTTGGGTTTGAGCTTGCTGTTCAGTCAGGCAGCCCCCAGGAG
CTGCAAGGGGAGTGTGGGTGCTTCTCTTAGTCCAGGCCAGCTCCTATCCCTGGCCTGA
CTGTTGCAGGGCTCGGGTGTGGCACAGGCTGCTGGCAGGAGGCAGGGAGCCATTCCT
GATGCTTGGTGTAGA [C/T] GTGTGTGTGCGCAGGGCACACGTCTGTGAGTGCTGT
GGCGGGCACACCTGTCTTCTGTTCTTGGACTGTCCCTCACTGGAT
AACCTCATCTCCAGAGATAATGGTTCAGTGAGAGACTGATTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTGAGACGGAGTCT-3'

[C/T] は、 *intron 1* の 3279番目 C > T の SNP を示す。

下線を付した CTGCGCCTTGACTCTGTT と TCTTGTCAGTGAGAGACTG は PCR primer を示し、下線を付した CCTATCCTGGCCTGACTGTT はシーケンスプライマーを示す。

(4) galectin-2 遺伝子 *intron 1* 3279 の SNP の galectin-2 遺伝子転写活性に与える影響

intron 1 3279 の SNP の galectin-2 遺伝子転写活性に与える影響を測定するために、レポーター遺伝子アッセイ（ルシフェラーゼアッセイ）を施行した。galectin-2 遺伝子の *intron 1* 3188 から 3404 までのヌクレオチドよりなる DNA フラグメントを、pGL3-enhancerベクターの SV40 エンハンサーの下流に、5' から 3' の方向にクローニングし、レポーターベクターを作製した。これらのレポーターベクターを HeLa 細胞および HepG2 細胞にトランスフェクションし、24 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

結果を図 2 (左図は HeLa 細胞、右図は HePG2 細胞での結果を示す) に示す。

(5) galectin-2 と微小管との相互作用

galectin-2 による LTA 分泌の制御機構を調べるために、タンデムアフィニティ一精製(TAP)システムを用いて、galectin-2 と相互作用する細胞内分子を探索した。その結果、galectin-2-TAP タグを発現させた場合のみに検出できる 2 つの特異的なバンドを同定した (図 3 a)。MALDI/TOF mass スペクトル分析により、これらの 2 つのバンドは、微小管の重要成分である α -及び β -チューブリンに対応することが示された。Flag のタグをつけた galectin-2 を発現するプラスミドでトランスフェクションした HeLa 細胞を用いて、内因性のチューブリン及び galectin-2 が一緒に免疫沈降することを確認した (図 3 b)。チューブリンは LTA とも一緒に免疫沈降した (図 3 b)。二重免疫染色した U937 細胞の共焦点顕微鏡分析像から、galectin-2 及び α -チューブリンは、細胞質に発達した網状フィラメントネットワークとして一緒に局在化していた (図 3 c)。この結果は galectin-2 が細胞内輸送に関与している可能性を示している。

(6) 冠状動脈粥腫切除術による試料における galectin-2 と LTA の発現と共局在

galectin-2 と LTA が、心筋梗塞の損傷 (即ち、冠状動脈のアテローム硬化性損傷) で発現しているかどうか、そして発現している場合にはその発現部位を調べるために、抗 LTA 又は抗 galectin-2 抗体を用いて、冠状動脈粥腫切除試料について免疫組織化学染色分析を行った。図 4 a 及び b に示す通り、LTA 及び galectin-2 についての免疫反応性が、アテローム斑の内膜細胞に検出され、そのうちの一部は紡錘体状、又は限定的に空胞化した丸い細胞質であった。隣接する切片を抗平滑筋細胞 (SMC) α -アクチン又は抗 CD68 で免疫染色した結果、これらの細胞の大部分は平滑筋細胞であるか、平滑筋細胞由来の泡沫細胞であり、マクロファージも一部に見られた (図 4 c 及び d)。二重標識免疫組織化学分析により、LTA と galectin-2 の共発現が大部分の多形性の平滑筋細胞で見られた (図

4 e)。対照的に、細胞質が僅かな纖維斑の萎縮性平滑筋細胞や、正常な内側の平滑筋細胞では、何れのタンパク質の発現も検出されなかった(図4 f)。これらの結果は、LTAとgalectin-2が、ヒトのアテローム硬化性斑の内膜の平滑筋細胞及びマクロファージでは共発現しているが、静止期又は正常な内側の平滑筋細胞では存在しないことを示している。

産業上の利用可能性

本発明により、心筋梗塞等の炎症性疾患の発症進展に関する新規な一塩基多型(SNP)が新たに同定された。本発明で同定されたSNPを利用することにより、心筋梗塞等の炎症性疾患の診断法、又は炎症性疾患の治療薬の開発法を提供することが可能になる。

請求の範囲

1. galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
2. galectin-2 遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
3. 配列番号1に示す galectin-2 遺伝子のイントロン1の塩基配列において3 2 7 9番目の塩基におけるC／Tの多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。
4. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項1から3の何れかに記載の方法。
5. 配列番号1に示す galectin-2 遺伝子のイントロン1の塩基配列において3 2 7 9番目の塩基を含む連続する少なくとも10塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項1から4の何れかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチド。
6. 配列番号1に示す galectin-2 遺伝子のイントロン1の塩基配列において3 2 7 9番目の塩基を含む連続する少なくとも10塩基の配列、及び／又はその相補配列を增幅することができ、請求項1から4の何れかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド。
7. プライマーがフォワードプライマー及び／又はリバースプライマーである請求項6に記載のオリゴヌクレオチド。
8. 請求項5から7のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの1種以上を含む、炎症性疾患診断用キット。
9. 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項8に記載のキット。
10. 配列番号1に示す galectin-2 遺伝子のイントロン1の塩基配列において3 2 7 9番目の塩基におけるC／Tの多型を検出することを含む、galectin-2 の発現状態の分析方法。
11. 候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝

子の発現量を分析し、その発現量を変化させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

12. 候補物質の存在下で細胞内の galectin-2 遺伝子又は galectin-1 遺伝子の発現量を分析し、その発現量を増大させる物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

13. 候補物質の存在下でリンホトキシン- α (LTA) と galectin-2 遺伝子産物又は galectin-1 遺伝子産物との結合を測定し、該結合を阻害する物質を選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

図 1

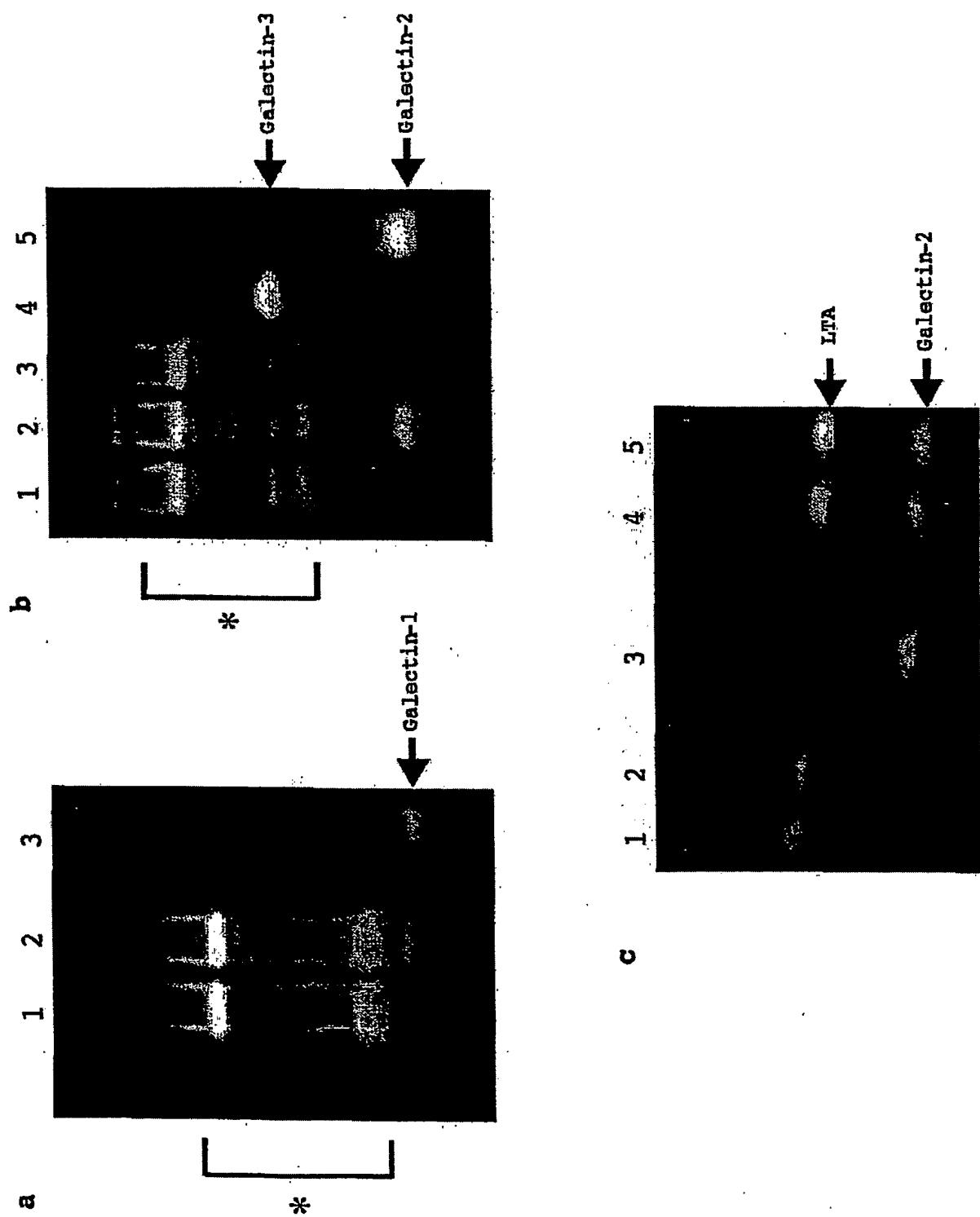


図 2

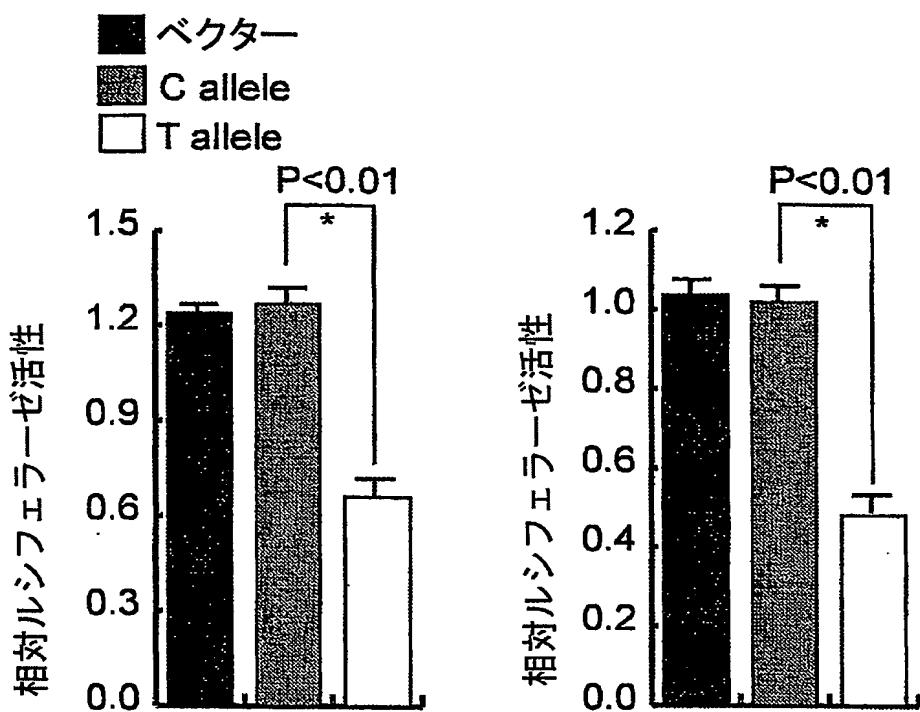


図 3

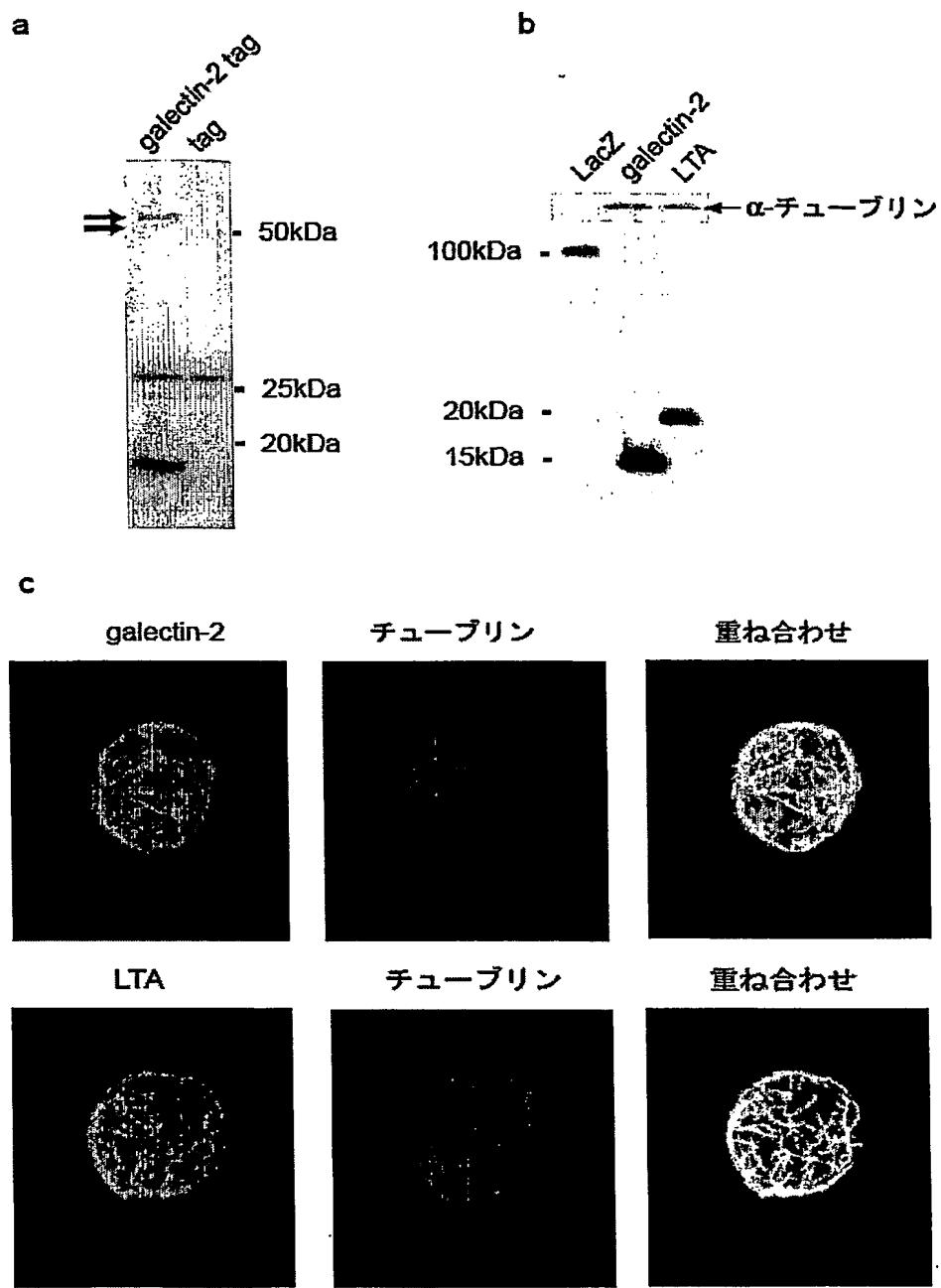
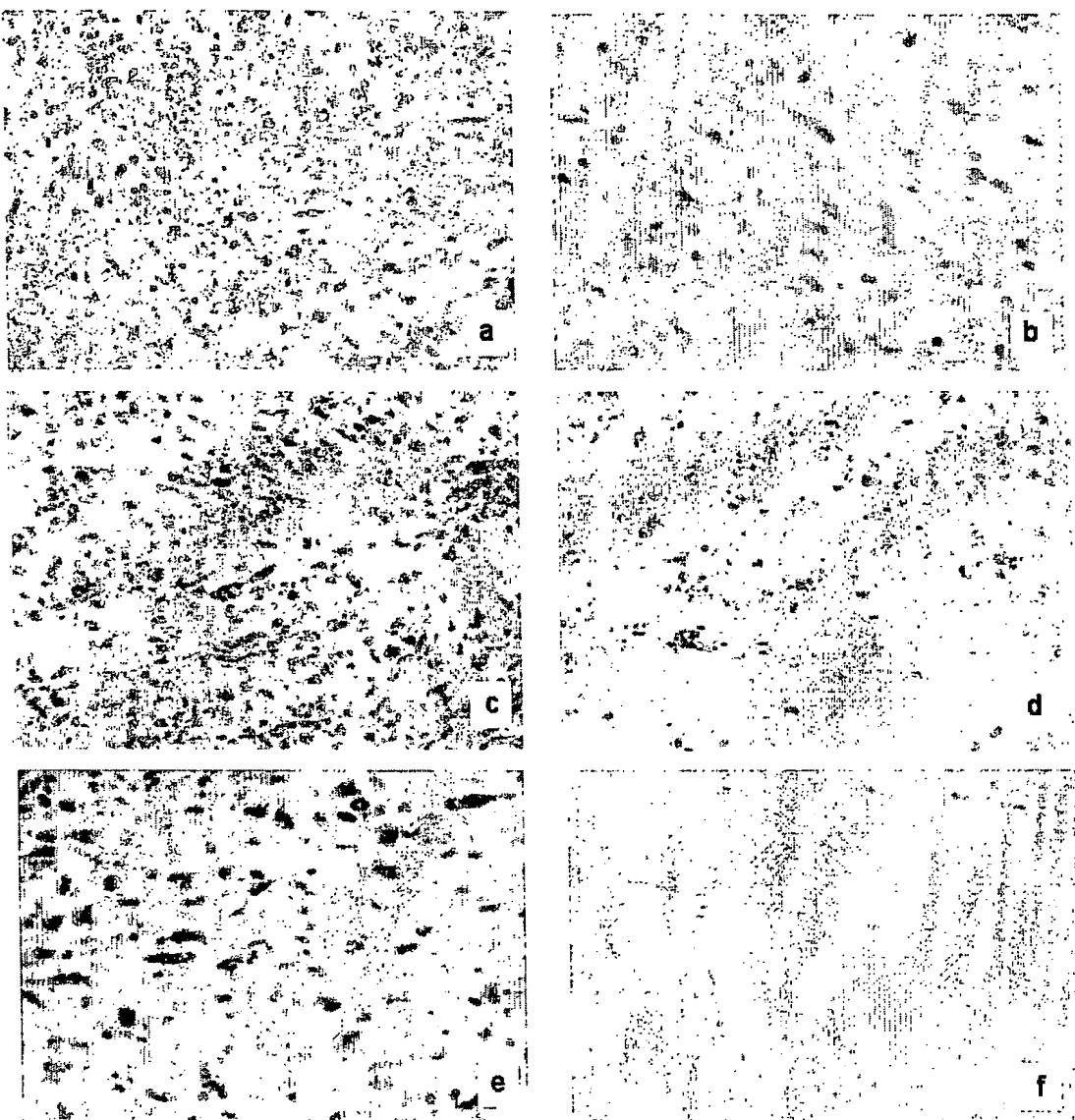


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN et al.

<120> Method for judging inflammatory diseases using single nucleotide polymorphism within galectin-2 gene

<130> A41618A

<160> 3

<210> 1

<211> 7967

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtgaggacac tagccccctg ctgcctgccc cactctgttc atctttgtct ttgcctgggt 60
ggggcctttt agggaaaacc attgctgtcc ctctctggc ctcagttcc ccatctgtgc 120
agcaaagaag ttggacagag gtctttttt aaaaaacagc atcttgggcc aggcgtggtg 180
gctcctgctt gtaatcccag cacttggga ggccgaggct ggtggatcat ctgaggttgg 240
gagtttgaga ccagcctgac caacatggag aaacccgtc tctactaaaa aaatacaaaa 300
ttggcttaggc ctggtggcac atgcctgtaa tcccgactaa tggggaggct gaggcaggag 360
aatcaactgg acctgggagg cagaggttat ggtgagccga gattgtgccaa ttgcactcca 420
gcctggcaa caagagttag actccatctc aaaacaacaa caacaataca gcatcttgct 480
ctgtcaccag gtggagtgca gtgggtggcaa tcataactca ctacggactt gaccccttg 540
gcttaaatga tcctcccacc tcagcctctt gagtagctgg gacccaggc actcaactacc 600
acactggcta attttgtttt tttctttct ttctctttt ttttttttt ttgagatgga 660
gtctcgctct gtggccagg ctggagtgca gtggcccgtat ctcaagctcac tgcaacctct 720
gctgcctggg ttcaagcaat tctctggctc cagcctccca agtagctggg attacaggta 780
tgtgtcacca cacctggcta atttttttt ttttgttag atggagttc tggtggccag 840
gctggagtgc aatggcacga tctcggtca ccacaacttc cacctcccag gttcaagcga 900
ttctcctgcc tcagcctcct gagtagcagg gattacaggc atgggccacc acacccgatt 960

aattttgtat ttttagtaga gatggggttt ctccatgttgc tcaggctgg tcttgaactc 1020
ctgatctcag gtgatccacc tgccttggcc tcccaaagtgc ctgggattac aggtgtgagc 1080
cactgctcct ggcctaattt ttgtatTTT aaagtagaga cagggtttca ccatgttggt 1140
caggctgatc tcgaactcct gacctcaggt gatccgcccac ccttggcctc ccaaagtgc 1200
gggattacag gtgtgagcca ccccacccag cttatttctt attttcgta gagatgaggt 1260
ctcactatgt tgctcaggct gatatcaaac tcctgggttc aaggatcct cctgccttgg 1320
cctctcgaaag tgctgagatt acagggtgtga gccactgtgc ctggcctcca ttgatcttta 1380
tagagataaa aaaaaatctc agcttggca atatagttag acctttctg ctacaggtgc 1440
atgccactac gcttgcctt aaaaattag tggggtagc ggcacactcc tcagccttgg 1500
gaggctgagg atcactttag cccaggaggt cgaggctaca gtgagccgta attgcactac 1560
tgtactccag cctggcaac agagttagac cttgtctcat atacccacac acaaaaccca 1620
agtcttggag agcaaattgc ccaaggccac aagctgcaaa tcacaagggg ttgagtggat 1680
tcccactgag gtctctgatt cgttgattct acaccagact ctgccacagc tttactgtgt 1740
ggccttggcc aagtcaactga ccgtctctga gccccagtttc tccttacate tgtggaagg 1800
gatcacaggg tgcctttctt gaggattaga tgggttatttc attgcctagg gctgcaataa 1860
caaattacca ccaaattgtg ggtggctca cacgatagac gtttggcttg tcttggttt 1920
ggtgactaga aacctgaaac caagggtgcta cagggctacg ctcctgctga aggcgcaagg 1980
ggagggttctt ttcttgcctc ttccagcttc tggggctcc tcgcattcct tggcttgcatt 2040
caactccaatc tctgcctcca acttcacgtg gactcctctg tgggttccg tctctgtgtc 2100
tatatttctc tcctttatg agaacactgg tcgtatttgg ttttaggacca accctaaacc 2160
agtatgaccc ttaaactcga ttacatatgc aaaggaacta tttttaaata ggtcacattg 2220
aggctggcg ggggtggctca cccctgtaat cccagcactt tggggaggccg aggcaggcgg 2280
atcactttagt atcaggaggtt caagaccagc ctggccaaaca tgggtgaaacc ctgtctgtac 2340
tgaaaataca aaaacaaaaaa agaagaagaa gaagaaaaaa aaatttagaca gatgttgg 2400
tgggcaccccg taatcccagc tacttggag gctgaggcag gagaatcggt tgaacccggg 2460
aggcagaggt tgcagtgagc cgagatcgag ccactgtact ccagcctagg tgacagagtg 2520
agacttcatc tcaaaaaaaaaaa aaaaaaaggt cacattgaca ggttccaggt ggacatgaat 2580

tttcggggga cgctattcaa gtgcaggggg gatcaggat gtgaatgtgc caggggtcct 2640
gcgtggaagg gtctatgccc tcatcacccct ctgcctctcg gggaggactg ctgtggccca 2700
cggaactctcc ccacccctc ttccctggtc atctcacccct tgccctttctt ttccctctc 2760
tccagctcca gaggccatat catccaaatc cttatacga cagataaggg aaccaaggcc 2820
cagaaagggg ctaagctggc cccaggcccc tctgccaatt agggcagag tcggcactag 2880
agtctggcc cccaaactccc caccccccga gctctaggga cgaccacacc cccaccagg 2940
tctgcctgtc tctctctgctg cctttgactc tgttggtgg ggacaaggct cccgggcctg 3000
cacccctcccg cagctctcag catccctatt tgtccaagtg cacccctgac cctggacttc 3060
cgagtgcttc tgccctgcag cagccccac ctctatcctt ggggtttgag ctttgctgtt 3120
tcagtcaggc agccccagg agctgcaagg ggagtgtgg tgcttctttt agtccaggcc 3180
cagctccctt atccctggcct gactgttgca gggctcgaaa tgtggcaca ggctgctggc 3240
aggaggcagg gagccatctc ctgatgcttg gtgttagacg tgtgtgtgcg cagggcacac 3300
gtctgtgagt gtctgtgtgg cgggcacacc tgtcttctgt ttcttggtt agccctttt 3360
ggactgtctt cactggataa cctcatctcc cagagataat ggtctttgtc agtgagagac 3420
tgattttttt tttttttttt ttttttttga gacggagttt ctgtctgtcg cccaggctgg 3480
agtgcagtgg cgccatctt gctcactgca agcaccgcct cccgggttca cgccattctc 3540
ctgcctcagc ctccccgagta gctggacta caggcgcctg ccaccacgcc cggctaattt 3600
tttgttatttt tagtagagac agggtttcac cgtgttagcc aggtatgtct cactctcctg 3660
acctcgtgat ccggcccccctt cggcctccca aagtgcgtgg attacaggtg tgagccaccc 3720
ccccctggcca gcaagagact gatTTTaatc ccgtctgtct ggctccaaaa tctggaccca 3780
accccggtgt gttaagcaaa gacatggggaa gttaggtgtc cagcctccaa accccacttt 3840
ctctaaagca gggaggtttt gctcccagga gacaacggac cctgtctggaa gacattctt 3900
gttgtcacccg ctcaggggag ggtgtcactg acatccagtg ggttagaggcc aggaataactg 3960
ctcaacatcc tacaacacaaa gagacagacc ccaacaaaga aatgcctgccc ccaaacgtcc 4020
agacggccaa ggctgagaag ctctggctg agcagccctcc tgcgtacat gcccggcgtca 4080
tggcccgctg tcctgggtta agcattgctg cctcctccag gcgtcttta taatgtac 4140
tgccaggccg ggcacagtggtt cttacacccctg taatcccaac actttggggag gccgaggtgg 4200

gaggatccctt tgagctcagg aggtcgaggc tggcctggac aacatagtga gaccccacatct 4260
aaaaaaaaaaa aaaatcagct gggccaggtg ggatgcctgt ggtccaggct acctgggggg 4320
ctgaggtggg aggattgctt gagcccaaga ggtcaaggct gtatgagct ctgatcatat 4380
cactgcactc tagcctgggt gacagagcaa gaccttaaa aaaaaatgta ttaccggctg 4440
aggcaggagg accacttgag ggtcaggagt tccagagcag cctggtaac atagcaaaac 4500
cctatctcta caaaaatttt aaaaatttcg tggcatggt ggcacacgtc tatagtcgt 4560
gctacttagg aggctgaggc aggagaatcg tttgagctca ggaggctatg aggctgcgt 4620
cagttagtta taatcgtgct actgcactcc atcttgggtg acagagcaag accctgtctc 4680
aaaaaaaaaaa aaaaaagaaaa gaaaagaaaa aaaatgctgg gtgtggtatac tcaccctat 4740
aatcccagaa ctttgggagg cccagagggg aggtcaactt gaggtcagga gttcagacc 4800
aacctggcca aagtggtaa accccgtctc tactaaaaat acaaagaaaa ttagctagat 4860
atggtggtgg gagcctgtaa tctcagtgac tcgggaggct gaggcaggat aattgcttga 4920
atctggaaag tggaggttgc agtgagccaa gattgcacca ctgcactcca gcatgggtga 4980
cagagtgaga ctccatctca acatctcaaa aaaaaaaaaa aaagaactta ctgcctgtgg 5040
aagagttgag caatacctaa caacctaccc ctacatgtga ccaaccagcg ggtcacttcc 5100
tcctctgcag agaggaggcg gctgccagcg agagggcact gagggcctc ccatggccac 5160
tgcccccttg acttctggca aagtggcca gtccaatgag ctcattcagg gcatctcaga 5220
tcatgcttt tctggaaata aaaagtcagt gagcagaact cccacaatgt aaaagtgtcc 5280
tcccataagt tggctaaat ctttgggcc tggcgtcc tggcagacc aaccctcacc 5340
ctctggtcat agatgcgaaa actggcttg ggtaatgagt tttttttt tttttttt 5400
agacagagtc ttgctctgtc gcctggcaca atctcggtc actgcaaccc ccacccctg 5460
ggtcaagcg attctcttgc ctcagcctcc caagtagctg ggacgacagg catgtgccac 5520
cacacccggc taattttgt attttaata gagacaggggt ttctccatgt tggcaggcc 5580
agtctcaaac tcctgacctc aggtgatcca cccgactcag cctccaaag tgctggatt 5640
acaggcgtga gccaccgctc ccagccctgg gtaatgagct ttgaaaaccc agcttagaaa 5700
tcttcctag taaccatcgt gaggctagag gaggctccta ctgtacagaaa attcaggtgc 5760
tgctttccta tgaaaataa ggagcagatg aatcttaaca acaagtaatc aaaatgatgg 5820

tcatttgggc agaccactgt ccagaaaaaa agaaaaaaatt taaaaaaagaa aattaaggct 5880
gggcttggtt cacgcctgta atcccagcac tttggggagc tgaggtggc agatcaattg 5940
aggccaggag tttgagacca gccacaccaa catggtgaaa ccttgtctc actaaaaatg 6000
caaaaattag gcatggtggt acatgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg 6060
agaatcgctt gaacctgaga ggtggaggtt gcagttagtc gagatcgac cgttgcactc 6120
cagcctggc gacaaagcaa gactctgctc aaaaaaaca aaaaaaaaaac aaaaaaagaa 6180
aaggaaagta aaacaataaa tcatggtggt cctgtgattt gctgttggc tacgtgaggc 6240
cctgtgcattt ggatttcaca aacatgttct tgaatcctct caaaaccagc ttgaaggttg 6300
gtggtgtctc cctgggtgtga cagggctgt catacagctg gcattcagca acaacaacaa 6360
caaaaataga aatgggagtc tcgctatgtt gcccaggctg gtctccaact cctggctca 6420
agtgaccctc ctgtctcagc atcctgagta gctggaatac aggtacacac ttccacaccc 6480
aggctatcaa ctgttttta aatgaataaa tcaaattagt caatttaca gaagggaaa 6540
gtgaggcttggagact ttgatggaca taggacttgc ggagtttat agattcttag 6600
ttttgttgc tttgtttgtt tttgttttg agacagagtc ttgctctgtt gcctaggctg 6660
gagtgcagtg gcgtgatctt gtcttactgc aacctctgcc tcccaggctt aagccgttct 6720
cctgcctcag cctcccaagt agctggact atagatgcgt gccaccacac ctggctaatt 6780
tttgcatttt tagtagagac agggttaaat gttaggcaga ctggtcttaa actcctgacc 6840
tcaggtgatc tggctgcctc ggccttccaa agtgctggga ttacaggtgt gagccactgt 6900
ccccggcctt tttttttgt ttttcttga gatgaaaagt cactcttgc gcccaggctg 6960
gagtgcataatg gtacgatctc agctcatggc aacctccgct tccagaattc aagcaattct 7020
cccgccctcag cctcccaagt agctgggatt acaggcgccc gccaccatgc gcagataatt 7080
tattttattt tattttattt attattatta ttattattat tattattatt tttgagatgg 7140
agtttcgctc tgcgtcccaag gctggagggc agtgacgcga tctcacctca ctgcaagctc 7200
cgccctccgg gttcacacca ttctcctgcc tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc 7260
acctgccacc acacccggct aacttttgtt atttttagta gagatgggtt ttcaccatgt 7320
tagccaggat ggtctcgatc tcctgacctc gtgatccgcc cgccctggcc tccaaaaagt 7380
gttgggattt caggtgttag ccaccgcgtc cggccaaattt ttttattttt agtagagacg 7440

aggtttcacc atgttgccca ggctgggtgc taactcctga cctcaggtga tcagcccgcc 7500
tcggcctccc aaaatgctgg gattacaggc gtgagcccc gcacctggcc agattagtt 7560
ttgggtggc caagatcttgcgccttgcctgtat acagtcattttccatatcat atttttgttt 7620
ctggggttct gctgagggca gcgtgatttc atcacttgcactttgcgg aactggcag 7680
gaagcacttgccttca tagatggca aactgagccttgcgttgccttcggg 7740
ttgggttgaa taagagcaaa acagggcagg gagtgggaa gctctggag gccttgatca 7800
gagcgctctg gctctgccac ttccagcatttgcgttgcgttgcctca cgtggcagg 7860
gggattgaga cctgcagctg ggttggcatg aggtggatga agctgctggg caagtgtggg 7920
attgattttc tgtgggact cgagtggaaat gtttctctgt tggccca 7967

<210> 2

<211> 9821

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gggagatgca ggccgggaga cacaaggtag aaggggcaaa gtcctcacct aggacattga 60
gggagttaat gttaatattt ctaggatata agcttgcacca cgagttgaga ccctgagcac 120
aggcctccag gagccgctgg gagctgccgc caggagctgt caccatgacg gtgaggacac 180
tagccccctg ctgcctgccc cactctgttc atctttgtct ttgcctgggt gggggctttt 240
agggaaaacc attgctgtcc ctctctggc ctcagttcc ccatctgtgc agcaaagaag 300
ttggacagag gtctttttt aaaaaacagc atcttggcc aggcgtggtg gtcctgctt 360
gtaatccag cacttggga ggccgaggct ggtggatcat ctgaggttgg gagtttgaga 420
ccagcctgac caacatggag aaaccccgac tctactaaaa aaataaaaaa ttggcttaggc 480
ctgggtggcac atgcctgtaa tccagctaa tggggaggct gaggcaggag aatcacttgg 540
acctgggagg cagaggttat ggtgagccga gattgtgccat ttgcactcca gcctggcaaa 600
caagagttag actccatctc aaaacaacaa caacaataca gcatcttgcctgtcaccag 660
gtggagtgcata gttgtggcaaa tcataactca ctacggactt gaccccttgcgttgc 720
tcctccacc tcaggcctttt gatgttgcgg gaccccgaggc actcactacc acactggcta 780

attttgggg tttcttttct ttctcttttt tttttttttt ttgagatgga gtctcgctct 840
gttgcggcagg ctggagtgca gtggcccgat ctcagctcac tgcaacctct gctgcctggg 900
ttcaagcaat tctctggtct cagcctccca agtagctggg attacaggta tgtgtcacca 960
cacctggcta atttttttt ttttggtag atggagtttc tgtgcctggag gctggagtgc 1020
aatggcacga tctcggctca ccacaacttc cacctcccag gtcaagcga ttctcctgcc 1080
tcagcctcct gagtagcagg gattacaggc atgggccacc acacccgatt aatttgtat 1140
ttttagtaga gatggggttt ctccatgttgc gtcaggctgg tcttgaactc ctgatctcag 1200
gtgatccacc tgccttggcc tcccaaagtgc ctgggattac aggtgtgagc cactgctcct 1260
ggcctaattt ttgtattttt aaagtagaga cagggtttca ccatgttggc caggctgatc 1320
tcgaactcct gacctcaggt gatccggcca cttggcctc ccaaagtgc gggattacag 1380
gtgtgagcca ccccacccag cttatttctt attttcgta gagatgaggt ctcactatgt 1440
tgctcaggct gatataaaac tcctgggttc aagggatcct cctgccttgg cctctcgaag 1500
tgctgagatt acaggtgtga gccactgtgc ctggcctcca ttgatctta tagagataaa 1560
aaaaaaatctc agcttggca atatagtgag acctttctg ctacaggtgc atgccactac 1620
gcttgcctt aaaaaattag tggggtagc ggcacactcc tcagccttgg gaggctgagg 1680
atcacttgag cccaggaggt cgaggctaca gtgagccgtt attgcactac tgtactccag 1740
cctggcaac agagttagac cttgtctcat atacccacac acaaaaacccaa agtctggag 1800
agcaaaattgc ccaaggccac aagctgcaaa tcacaagggg ttgagttggat tcccaactgag 1860
gtctctgatt cggtgattct acaccagact ctgccacagc tttactgtgt ggccttggcc 1920
aagtcaactga ccgtctctga gccccagttct tccttacatc tgtggaagg gatcacaggc 1980
tgcctcttctt gaggattaga tgggttattt attgcctagg gctgcaataa caaattacca 2040
ccaaattgtg ggtggcttca cacgatagac gtttggcttg tcttggttt ggtgactaga 2100
aacctgaaac caaggtgcta cagggtacg ctccgtctga aggcccaagg ggagggttct 2160
ttcttgcttc ttccagcttc tgggtggctcc tcgcattcct tggcttgcattt cactccaatc 2220
tctgcctcca acttcacgtt gactcctctg tgggttccg tctctgtgtc tatatttctc 2280
tcctctttagt agaacactgg tcgtattgga ttttaggacca accctaaacc agtatgacct 2340
cttaactcgaa ttacatatgc aaaggaacta tttttaaata ggtcacatttggc 2400

gggtggctca cccctgtaat cccagcactt tgggaggccg aggcaggcgg atcacttgag 2460
atcaggagtt caagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc ctgtctgtac taaaaataca 2520
aaaacaaaaaa agaagaagaa gaagaaaaaa aaattagaca gatgttgtgg tgggcacccg 2580
taatcccagc tacttgggag gctgaggcag gagaatcggt tgaacccggg aggcagaggt 2640
tgcagtgagc cgagatcgag ccactgtact ccagcctagg tgacagagtg agacttcac 2700
tcaaaaaaaaaa aaaaaaaggt cacattgaca gttccaggt ggacatgaat ttccggggga 2760
cgctattcaa gtgcaggggg gatgcaggat gtgaatgtgc caggggtcct gcgtggaagg 2820
gtctatgccc tcatcacccct ctgcctctcg gggaggactg ctgtggccca cggactctcc 2880
ccaccttctc ttccctggtc atctcacctc tgcctttct ttccctctctc tccagctcca 2940
gaggccatat catccaaatc cttatacga cagataaggg aaccaaggcc cagaaagggg 3000
ctaagctggc cccaggcccc tctgccaatt agggcagag tcggcactag agtctggcc 3060
cccaactccc cacccccccca gctctaggaa cgaccacacc cccacccagt tctgcctgtc 3120
tctctctgctg cctttgactc ttttgggtgg ggacaaggct cccgggcctg caccctcccg 3180
cagctctcag catccctatt tgtccaagtg caccctgac cctggacttc cgagtgcctc 3240
tgccctgcag cagcccccac ctctatcctt ggggtttgag ctttgctgtt tcaagtcaaggc 3300
agcccccagg agctgcaagg ggagtgtgg tgcttcttt agtccaggcc cagctccct 3360
atcctggcct gactgttgca gggctgggg tgtggcaca ggctgctggc aggaggcagg 3420
gagccatctc ctgatgctt gtttagacg tgtgtgtgcg cagggcacac gtctgtgagt 3480
gtctgtgtgg cggcacacc tgtctctgt ttcttgggg agccctttt ggactgtcct 3540
cactggataa cctcatctcc cagagataat ggtcttgc agtgagagac tgatttttt 3600
ttttttttttttttttaa gacggagtct cgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtgg 3660
cgccatctt gctcaactgca agcaccgcct cccgggttca cggcattctc ctgcctcagc 3720
ctcccgagta gctgggacta caggcgcctg ccaccacgcc cggctaattt tttgtatTTT 3780
tagtagagac agggtttcac cgtgttagcc agatgtatct cactctctg acctcgtat 3840
ccggcccccct cggcctccca aagtgtggg attacaggtg tgagccaccg cccctggcca 3900
gcaagagact gatTTAATC ccgtctgtct ggctccaaaa tctggaccctt accccgttgt 3960
gttaagcaaa gacatgggaa gtttaggtgtc cagcctccaa accccacttt ctctaaagca 4020

gggagggttt gctcccagga gacaacggac cctgtctgga gacattctt gttgtcaccg 4080
ctcaggggag ggtgtcaactg acatccagtg gtagaggcc aggaatactg ctcaacatcc 4140
tacaacacaa gagacagacc ccaacaaaga aatgcctgcc ccaaacgtcc agacggccaa 4200
ggctgagaag ctctggtctg agcagcctcc tgtctgacat gccgcgtca tggcccgctg 4260
tcctgggta agcattgctg ctcctccag gcgtcttta taaaatgtac tgccaggccg 4320
ggcacagtgg cttacacctg taatccaaac actttggag gccgaggtgg gaggatcctt 4380
tgagctcagg aggtcgaggc tggcctggac aacatagtga gaccccatct gaaaaaaaaa 4440
aaaatcagct gggccaggtg ggatgcctgt ggtccaggct acctgggggg ctgaggtggg 4500
aggattgctt gagcccaaga ggtcaaggct gtagtgagct ctgatcatat cactgcactc 4560
tagcctgggt gacagagcaa gaccttaaa aaaaaatgta ttaccggctg aggcaaggagg 4620
accacttgag ggtcaggagt tccagagcag cctggtaac atagcaaaac cctatctcta 4680
caaaaattt aaaaattagc tggcatggt ggcacacgtc tatagtcgta gctacttagg 4740
aggctgaggc aggagaatcg tttgagctca ggaggctatg aggctgcatg cagtgagtt 4800
taatcgtct actgcactcc atctgggtg acagagcaag accctgtctc aaaaaaaaaa 4860
aaaaaaagaaa gaaaagaaaa aaaatgtgg gtgtggtac tcacccctat aatcccagaa 4920
ctttgggagg cccagagggg aggatcaactt gaggtcagga gttcgagacc aacctggcca 4980
aagtggtaa accccgtctc tactaaaaat acaaagaaaa ttagctagat atgggtgg 5040
gagcctgtaa tctcagtgac tcggaggct gaggcaggat aattgcttga atctggaaag 5100
tggaggttgc agttagccaa gattgcacca ctgcactcca gcatgggtga cagagtgaga 5160
ctccatctca acatctcaaa aaaaaaaaaa aaagaactta ctgcctgtgg aagagttgag 5220
caataacctaa caacctaccc ctacatgtga ccaaccagcg ggtcaattcc tcctctgcag 5280
agaggaggcg gctgccagcg agagggcact gagggtcctc ccatggccac tgccccctt 5340
acttctggca aagtggccca gtccaatgag ctcattcagg gcatctcaga tcatgtttt 5400
tctggaaata aaaaagtcagt gagcagaact cccacaatgt aaaagtgtcc tcccataagt 5460
tgttctaaat cttggtgcc tgttgcgtcc tggtcagacc aaccctcacc ctctggcat 5520
agatgcgaaa actggtcttggtaatgagt ttttttttt tttttttttt agacagagtc 5580
ttgctctgtc gcctggcaca atctcggtcc actgcaacct ccacccctt ggttcaagcg 5640

attctcttgc ctcaagcctcc caagtagctg ggacgcacagg catgtgccac cacaccggc 5700
taattttgt attttaata gagacagggt ttctccatgt tggccaggcc agtctcaaac 5760
tcctgaccc tc aggtgatcca cccgactcag cctccaaag tgctggatt acaggcgtga 5820
gccaccgctc ccagccctgg gtaatgagct ttgaaaaccc agcttagaaa tcttcctag 5880
taaccatcg t gaggctagag gaggctccta ctgtacagaa attcaggtgc tgcttccta 5940
tggaaaataa ggagcagatg aatcttaaca acaagtaatc aaaatgatgg tcatttggc 6000
agaccactgt ccagaaaaaa agaaaaaatt taaaaaagaa aattaaggct gggcttggtt 6060
cacgcctgta atcccagcac tttggggagc tgaggtggc agatcaattg aggccaggag 6120
ttttagacca gccacaccaa catggtggaaa cttgtctct actaaaaatg caaaaattag 6180
gcatggtggt acatgcctgt agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatcgctt 6240
gaacctgaga ggtggagggt gcagtggagtc gagatcgac cgttgcactc cagcctggc 6300
gacaaagcaa gactctgctc aaaaaaaca aaaaaaaaaac aaaaaaagaa aaggaaagta 6360
aaacaataaa tggatgggtt cctgtgattt gctgtggc tacgtgaggc cctgtgcatt 6420
ggatttcaca aacatgttct tgaatcctct caaaaccagc ttgaaggttt gtgggtctc 6480
cctgggtgtga cagggtctgt catacagctg gcattcagca acaacaacaa caaaaataga 6540
aatgggagtc tcgctatgtt gcccaggctg gtctccaact cctggctca agtgcaccc 6600
ctgtctcagc atcctgatgt gctggaaatac aggtacacac ttccacaccc aggctatcaa 6660
ctgttttta aatgaataaa tcaaatttttcaatttaca gaagggaaa gtgaggctt 6720
gagagagact ttgatggaca taggacttgc ggagtttat agattcttag tttttttcg 6780
tttgggtttt ttttttttgc agacagagtc ttgctctgtt gcctaggctg gagtgcagt 6840
gcgtgatctt gtcttactgc aacctctgcc tcccaggctt aagccgttct cctgcctcag 6900
cctcccaagt agctggact atagatgcgt gccaccacac ctggctaatt tttgcatttt 6960
tagtagagac agggtaaat gtttaggcaga ctggctttaa actcctgacc tcaggtgatc 7020
tggctgcctc ggccttccaa agtgcgtggaa ttacaggtgt gagccactgt gcccggcctt 7080
tttttttgt ttttcttgc gatgaaaagt cactcttgc gcccaggctg gagtgcattt 7140
gtacgatctc agctcatggc aacctccgct tccagaattc aagcaattct cccgcctcag 7200
cctcccaagt agctggatt acaggcgccc gccaccatgc gcagataatt tattttattt 7260

tatTTTATTt attattatta ttattattat tattattattttt gagatgg agtttcgctc 7320
tgtcgcccaag gctggaggc agtgacgcga tctcacctca ctgcaagctc cgcctccgg 7380
gttcacacca ttctcctgcc tcagccccc gagtagctgg gactacaggc acctgccacc 7440
acacccggct aacttttgtt attttagta gagatggggtt ttcaccatgt tagccaggat 7500
ggtctcgatc tcctgaccc tcgtatccgc cgcctcgcc tccaaaaagt gttgggatta 7560
caggtgtgag ccaccgcgtc cggccaattt tttatTTTt agtagagacg aggtttcacc 7620
atgttgccca ggctgggtgc taactcctga cctcaggtga tcagcccccc tcggcctccc 7680
aaaatgctgg gattacaggc gtgagccct gcacctggcc agatTTtagtt ttgggtggc 7740
caagatcttgc tgccctgtat acagtcatTTt tccatatcat atTTTgtttt ctggggttct 7800
gctgagggca gcgtgatttc atcacttgc aactttgcgg aactggcag gaagcactct 7860
gcccatttca tagatggca aactgagcct ccgtcctgtg cctttcggg ttgggtgga 7920
taagagcaaa acagggcagg gagtgggaa gctctggag gccttgcata gaggcgtctg 7980
gctctgccccac ttccagctt ggtggctcc tgcgtccatca cgtggcagg gggattgaga 8040
cctgcagctg ggtggcatg aggtggatga agctgctggg caagtgtggg attgattttc 8100
tgtgggact cgagtggaaat gtttctctgt tggcccgagg ggaacttgag gtttggaaaca 8160
tggacatgaa gccggggta accctgaaga tcacaggcag catcgccat ggcactgtat 8220
ggtgagcaag gtttcagggt tggggagtc tgcaggccc gaataggcag ggcgggtggg 8280
gcaggcaggg cagccctgtg aagtgcgtcag gcaagaggga cgtcaggcca atggccctt 8340
tttccacaccc ttctccccac acccctgtg gccccactt catgtctgag gcttaggttt 8400
gggacctgca gaatttcaga gttgatgcca tatgcttat tctttgcctt caacagccat 8460
tgaagggca ggtggagaag cccctggaaac tctgtctggc cccctgcggg gcaggtgcct 8520
ctagggaacg cccaaatccc cagagacacc accctctta cccagcagaa tggccacagg 8580
ctggcatttc atgagcatta aaccaggca gccaccagg gaggctgagt ggtctcgctg 8640
gcattccttt ggttagaacc agcggcctca ccacccctgt gagtacagt ccagcgaaag 8700
gctctctgc ctgcagaaca tgtcagcgca tcttggaaact gtgcTTTtac tactttgg 8760
tagagagggg gcgggcagggt gcatgccata ggagctaagg gaaaagtgac ttatttctcc 8820
tacttgggtc cctcaagttt gtcaaaatgt gtgataccct tggctgaga ctcccaaattt 8880

aagacacccc atgaccaga atgcccact ttcaggaacc ctgcaggctc agcccaggct 8940
cctgttagtga tcttgccaag aagtcataca accccggttg cacacccata gtgacaggga 9000
gctcaccacc tttaggttggc tgctggtggc taaatttaat aggtcttcag atatctaaga 9060
gatagcattt ctctctccca ggagagccac ccccaattcc cgaagctgtc actatcagtt 9120
acccttctct caacagcgtg atccctgctc caaatggaat gtgctaccac agtgctaagt 9180
ctgagcaggt tgttacctcc cttgtttaa ggcacagatc tcaactaaca caagcttga 9240
ttcttccagc ttgtggtcaa ccaaggctc ccaacccaag ctgctttatc caggcctgag 9300
ccctgaacct cacctgctac cccttctcct gcagctttgt aattaatctg ggccagggga 9360
cagacaagct gaacctgcat ttcaaccctc gttcagcga atccaccatt gtctgcaact 9420
cattggacgg cagcaactgg gggcaagaac aacgggaaga tcacctgtgc ttcagccag 9480
ggtcagaggt caaggtgagg tcaaaggggg aaagggcact ggggtgatgt caaggggagg 9540
gcccgatgg aagagagcct ggcctggaca caggtgctgg cttgtttga gccatcaggc 9600
actgccctgg cccatttcca gggcctcctg ctccttgac accctccctc cccacagttc 9660
acagtgaccc ttgagagtga caaattcaag gtgaagctgc cagatggca cgagctgact 9720
tttcccaaca ggctgggtca cagccacctg agtacactga gcgtaagggg cgggtcaac 9780
atgtcctctt tcaagttaaa agaataaaag acttccagcc g 9821

<210> 3

<211> 558

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cccccccaac tctagggacg accacacccc cacccagttc tgctgtctc tctctgcgcc 60
tttgactctg ttgggtgggg acaaggctcc cgggcctgca ccctcccgca gctctcagca 120
tccctatttg tccaagtgc a cccctgaccc tggacttccg agtgcctctg ccctgcagca 180
gcccccacct ctatccttgg ggttgagct ttgctgtttc agtcaggcag cccccaggag 240
ctgcaagggg agtgtgggtg cttctcttag tccaggccca gctccctat cctggcctga 300
ctgttgcagg gctcggttggc acagg ctgcgtggcag gaggcaggga gccatctcct 360

gatgcttgggt gttagaygtg tgtgtgcgca gggcacacgt ctgtgagtgt ctgtgtggcg 420
ggcacacacctg tcttctgttt cttgttttag ccccttttgg actgtcctca ctggataacc 480
tcatctccca gagataatgg tctttgtcag tgagagactg attttttttt tttttttttt 540
tttttgaga cgaggatct 558

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁷ C12Q1/68, G01N/33/15//C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁷ C12Q1/68, G01N/33/15, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RABINOVICH GA. et al., Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis., J. Exp. Med., 1999, 190(3), p.385-98	11-12
X	Rabinovich GA. et al., Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?, Trends Immunol., 2002, 23(6), p.313-20	11-12
X	WO 99/12041 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA), 11 March, 1999 (11.03.99), Particularly, Claim 10 & US 5948628 A & US 6054315 A & US 6225071 B1	11-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 September, 2004 (24.09.04)Date of mailing of the international search report
12 October, 2004 (12.10.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	OZAKI K. et al., Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro., Nature, 2004 May, 429(6987), p.72-5	5-10,13
P,X	Yozo ONISHI et al., "Genome Wide SNP Kaiseki ni yoru Shinkin Kosoku Kanren Idenshi no Tanri", The Journal of Japanese College of angiology, 2004 May, 44(5), pages 175 to 178	5-10,13
A	OZAKI K. et al., Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction., Nat.Genet., 2002, 32(4), p.650-4	5-13
A	Coville G., Human DNA sequence from clone RP5-1177I5 on chromosome 22q13. Contains a novel gene, the MSE55 gene for serum constituent protein MSE55, the LGALS2gene for soluble Galactose-binding Lectin 2(Galectin 2, S-Lac Lectin 2, HL14), ESTs, an STS, GSSs and two putative CpG islands, complete sequence., Database GenBank accession No.AL022315, 2003 June, particularly, complement(72609..82346)	5-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1–4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet.)
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012151

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Concerning "a method of judging an inflammatory disease" according to claims 1 to 4, it is stated in the description of the present case "the term "judge" as used herein means the judgment of the presence/absence of the onset of a disease, the judgment of the possibility of the onset of a disease (assumption of the onset risk), the clarification of genetic cause of a disease and so on" (p.7, lines 2-3). That is, claims 1 to 4 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims 5 to 13 can be divided into the following invention groups.

(1) A method of detecting a gene polymorphism participating in an inflammatory disease or a method of screening a remedy for an inflammatory disease wherein galectin-2 gene or a galectin-2 gene product is employed (the inventions according to claims 5 to 10 and the parts relating to galectin-2 gene or a galectin-2 gene product in the inventions according to claims 11 to 13).

(2) A method of screening a remedy for an inflammatory disease wherein galectin-1 gene or a galectin-1 gene product is employed (the parts relating to galectin-1 gene or a galectin-1 gene product in the inventions according to claims 11 to 13).

There is no such a high homology (about 45%) between a galectin-1 gene product and a galectin-2 gene product as allowing the estimation that they belong to the same category of proteins having equivalent functions and, therefore, the above invention groups (1) and (2) have no matter in common.

That is to say, there is no matter common to the above invention groups (1) and (2) that is seemingly a special technical feature in the meaning of the second sentence of PCT Rule 13.2 and, therefore, no technical relevancy can be found between these invention groups differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

Such being the case, it is obvious that claims 5 to 13 do not comply with the requirement of unity of invention.

Accordingly, the claims have the following 2 groups of inventions.

(1) The inventions according to claims 5 to 10 and the parts relating to galectin-2 gene or a galectin-2 gene product in the inventions according to claims 11 to 13.

(2) The parts relating to galectin-1 gene or a galectin-1 gene product in the inventions according to claims 11 to 13.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12Q1/68, G01N/33/15 // C12N15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. Cl' C12Q1/68, G01N/33/15, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS/WPI(DIALOG), PubMed, JSTPlus(JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	RABINOVICH GA. et al., Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. J. Exp. Med., 1999, 190(3), p. 385-98	11-12
X	Rabinovich GA. et al, Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends Immunol., 2002, 23(6), p. 313-20	11-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.09.2004

国際調査報告の発送日

12.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

上條 肇

4 B 3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 99/12041 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA) 1999. 03. 11, 特に, 請求の範囲10 & US 5948628 A & US 6054315 A & US 6225071 B1	11-12
PX	OZAKI K. et al., Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. Nature, 2004 May, 429 (6987), p. 72-5	5-10, 13
PX	大西洋三, 他1名, ゲノムワイドSNP解析による心筋梗塞関連遺伝子の単離, 脈管学, 2004 May, 44(5), p. 175-178	5-10, 13
A	OZAKI K. et al, Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. Nat. Genet., 2002, 32(4), p. 650-4	5-13
A	Coville G., Human DNA sequence from clone RP5-1177I5 on chromosome 22q13. 1Contains a novel gene, the MSE55 gene for serum constituent protein MSE55, the LGALS2gene for soluble Galactose-binding Lectin 2(Galectin 2, S-Lac Lectin 2, HLL4), ESTs, an STS, GSSs and two putative CpG islands, complete sequence. Database GenBank accession No. AL022315, 2003 Jun, 特に、complement(72609..82346)	5-13

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1-4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
特別ページ参照。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<第II欄1.について>

請求の範囲1-4に係る「炎症性疾患の判定方法」について、本願明細書には「本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。」（第7頁第2-3行）旨説明されているから、請求の範囲1-4は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

<第III欄について>

請求の範囲5-13は次の発明群に分けられる。

- (1) galectin-2遺伝子またはgalectin-2遺伝子産物を用いる炎症性疾患に関する遺伝子多型の検出方法、または炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法（請求の範囲5-10に係る発明および請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-2遺伝子またはgalectin-2遺伝子産物に係る部分）
- (2) galectin-1遺伝子またはgalectin-1遺伝子産物を用いる、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法（請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-1遺伝子またはgalectin-1遺伝子産物に係る部分）

galectin-1遺伝子産物とgalectin-2遺伝子産物とは、両者が同等の機能を有する一群の蛋白質であると推定するに足るほどに配列同一性を有しない（約45%）ので、上記発明群(1)-(2)に共通の事項は存在しない。

以上により、上記発明群(1)-(2)においてPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

よって、請求の範囲5-13は单一性の要件を満たしていないことは明らかである。

したがって、請求の範囲には、

- (1) 請求の範囲5-10に係る発明および請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-2遺伝子またはgalectin-2遺伝子産物に係る部分
- (2) 請求の範囲11-13に係る発明のうちgalectin-1遺伝子またはgalectin-1遺伝子産物に係る部分の2発明が記載されている。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.